

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international**



**(43) Date de la publication internationale
24 janvier 2002 (24.01.2002)**

PCT

**(10) Numéro de publication internationale
WO 02/06443 A2**

- (51) Classification internationale des brevets⁷ :** C12N **(74) Mandataire :** AVENTIS CROPS SCIENCE S.A.; Département Propriété Industrielle- Franck Tetaz, 14-20, rue Pierre Baizet, Boite Postale 9163, F-69263 Lyon Cedex 09 (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale :** PCT/FR01/02216
- (22) Date de dépôt international :** 10 juillet 2001 (10.07.2001)
- (25) Langue de dépôt :** français
- (26) Langue de publication :** français
- (30) Données relatives à la priorité :**
00/09250 13 juillet 2000 (13.07.2000) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :** RHO-BIO [FR/FR]; 14-20, rue Pierre Baizet, Boite Postale 9163, F-69263 Lyon (FR).
- (72) Inventeurs; et**
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :** VERDAGUER, Bertrand [FR/FR]; 9, avenue Amans Rodat, F-12000 Rodez (FR). FOURNIER, Joëlle [FR/FR]; 54, rue de Capèle d'Ox, F-31600 Muret (FR). ESQUERRE-TUGAYE, Marie-Thérèse [FR/FR]; 11, rue du Château d'Eau, F-31320 Castanet-Tolosan (FR). BEFFA, Roland [FR/TR]; 41, allée Antonin Dumas, F-69230 St. Genis Laval (FR). GROSJEAN-COURNOYER, Marie-Claire [FR/FR]; 9bis, rue du Capitaine Ferber, Allée H, F-69300 Caluire (FR).
- (81) États désignés (national) :** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) États désignés (régional) :** brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :**
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

(54) Title: LIPOXYGENASE-INDUCIBLE PROMOTER, EXPRESSION CASSETTES COMPRISING SAME AND TRANSFORMED PLANTS

(54) Titre : PROMOTEUR INDUCTIBLE DE LIPOXYGENASE, CASSETTES D'EXPRESSION LE COMPRENANT ET PLANTES TRANSFORMÉES

(57) Abstract: The invention concerns novel polynucleotides comprising a novel regulating sequence promoting a tobacco lipoxigenase gene inducible by an inducer and in particular in response to a stress by a pathogen. The invention also concerns an expression cassette comprising said regulating promoter sequence. The invention further concerns plant cells or plants transformed with said inventive polynucleotide or expression cassette.

(57) Abrégé : La présente invention concerne de nouveaux polynucléotides comprenant une nouvelle séquence de régulation promotrice d'un gène de lipoxigenase de tabac inductible par un agent inducteur et notamment en réponse à une agression par un pathogène. Elle concerne également une cassette d'expression comprenant cette séquence de régulation promotrice selon l'invention. L'invention a également pour objet des cellules végétales ou des plantes transformées avec un polynucléotide ou une cassette d'expression selon l'invention.

WO 02/06443 A2

Promoteur inductible de lipoxygénase, cassettes d'expression le comprenant et plantes transformées

La présente invention concerne des polynucléotides comprenant une nouvelle
5 séquence de régulation promotrice inductible en réponse à une agression par un
pathogène ou en réponse à un autre agent d'induction. La présente invention a également
pour objet des cassettes d'expression et des vecteurs comprenant une séquence de
régulation promotrice selon l'invention qui contrôle l'expression d'une séquence codante
et notamment d'une séquence codante hétérologue, hétérologue signifiant ici une
10 séquence codante différente de la séquence codante native. L'invention concerne
également un organisme hôte et notamment des cellules végétales et des plantes
transformées avec un polynucléotide, une cassette d'expression ou un vecteur selon
l'invention.

Les lipoxygénases (LOXs) de plantes sont impliquées dans des processus
15 physiologiques variés et ces fonctions peuvent être assurées par différentes isoenzymes.
Cette diversité dans les fonctions biologiques se traduit aussi par des mécanismes de
régulation ainsi que des localisations tissulaires et subcellulaires différentes selon les
isoformes. Un rôle important est attribué aux LOXs dans les réponses aux stress, en
particulier la blessure, et les attaques parasitaires (Blée, Prog. Lipid Res., 1:33-37,
20 1998). Une forte induction de l'expression de gènes LOX est ainsi mesurée dans de
nombreuses plantes monocotylédones ou dicotylédones interagissant avec des bactéries,
des virus ou des champignons, ainsi que suite à des blessures mécaniques ou causées par
des insectes sur les feuilles. Un ADNc et un fragment génomique codant une LOX de
tabac a été cloné (Rancé, Thèse de Doctorat de l'Université de Paris XI, 1997; Véronési
25 et al., Plant Physiol., 108:1342, 1995; GenbankX84040). Des expériences
d'hybridation ADN/ARN (hybridation de type northern) ont montré que ce gène LOX
s'exprime dans des cellules de tabac en culture consécutivement à l'application
d'éléliciteur et dans des plantes de tabac inoculées par le champignon *Phytophthora*
parasitica nicotianae, Ppn (Véronési et al., Plant Physiol., 112:997-1004, 1996). Chez
30 *Arabidopsis thaliana*, il existe au moins deux gènes codant des LOXs. Le gène *AtLOX1*
s'exprime de manière constitutive dans tous les organes de la plante avec des niveaux
d'expression plus élevés dans les racines et dans les jeunes germinations (Melan et al.,
Plant Physiol., 101:441-450, 1993). Une forte induction de l'activité *AtLOX1* est détectée

consécutivement à l'infection par *Pseudomonas syringae*. Une accumulation différentielle des transcrits LOX est mise en évidence entre une interaction compatible ou incompatible. L'induction de l'expression du gène est en effet plus importante et plus précoce après inoculation par une souche avirulente. Par ailleurs il a été montré que

5 l'expression du gène *AtLOX1* était inductible après traitement par le MeJa (méthyl jasmonate) ou par l'acide abscissique. Un autre gène *AtLOX2*, divergent au niveau de sa séquence peptidique (environ 40% de similarité avec les séquences protéiques d'*Arabidopsis AtLOX1* et de tabac *NtLOX1*) et possédant une séquence d'adressage aux chloroplastes, est préférentiellement impliqué dans la synthèse d'acide jasmonique en

10 réponse à la blessure (Bell *et al.*, PNAS, 92:8675-8679, 1995). Des ADN complémentaire codant des LOXs ont notamment été isolés chez la pomme de terre, la tomate, le riz, l'orge, le soja, le pois et le haricot.

Cependant, un nombre restreint de gènes de LOXs spécifiquement impliquées dans les mécanismes de résistance des plantes ont été isolés. Par conséquent, le nombre

15 de promoteurs de gènes LOX de plantes caractérisés est limité en regard des nombreux clones d'ADNc isolés. Le promoteur du gène *AtLOX1* induit par la pathogénèse n'a pas été isolé et caractérisé et les promoteurs de gènes LOX isolés jusqu'à présent concernent des LOXs normalement exprimées dans les graines, au cours de la germination ou de la maturation des fruits. Rouster *et al.* (Plant J., 11:513-523, 1997) ont ainsi isolé le

20 promoteur de la LOX1 de l'orge, normalement active dans les germinations et dans les feuilles traitées par le MeJa. Le promoteur de la LOX2 du pois a aussi été cloné et utilisé pour l'expression du gène rapporteur *uidA* dans des plantes de tabac transgéniques (Forster *et al.*, Plant Mol. Biol., 26:235-248, 1994). Les résultats montrent des niveaux d'expression élevés dans les graines, les feuilles et les tiges. Le promoteur cloné ne

25 présente donc pas de spécificité tissulaire marquée alors que le gène de la LOX2 de pois est préférentiellement exprimé dans les graines. Les promoteurs de deux gènes LOX de la tomate qui s'expriment normalement au cours de la maturation des fruits ont aussi été isolés (Beaudoin et Rothstein, Plant Mol. Biol., 33:835-846, 1997). Des promoteurs LOX ayant une activité spécifique des mécanismes de défenses et de résistance des

30 plantes n'ont pas encore été isolés et caractérisés.

La présente invention concerne un promoteur de lipoxygenase 1 de tabac. Ce promoteur a un profil d'expression spécifique des mécanismes de défenses des plantes, il

est activé en réponse à un agent inducteur et notamment en réponse à l'agression d'une plante par un agent pathogène.

Description de la liste de séquences

5

SEQ ID NO.1: Promoteur de la lipoxigenase 1 de tabac

SEQ ID NO. 2-3: Amorces PCR

Description de l'invention

10 **Polynucléotides**

La présente invention concerne de nouveaux polynucléotides comprenant une séquence de régulation promotrice fonctionnelle dans les plantes.

Par séquence de régulation promotrice, on entend selon l'invention la région non codante d'un gène impliquée dans la liaison avec l'ARN polymérase et avec d'autres
15 facteurs qui sont responsables de l'initiation et de la régulation de la transcription conduisant à la production d'un transcrit d'ARN.

Selon la présente invention, on entend par "polynucléotide" une chaîne nucléotidique simple brin ou son complémentaire ou une chaîne nucléotidique double brin pouvant être de type ADN ou ARN. De préférence, les polynucléotides de
20 l'invention sont de type ADN, notamment d'ADN double brin. Le terme "polynucléotide" désigne également les oligonucléotides et les polynucléotides modifiés.

Les polynucléotides de la présente invention sont isolés ou purifiés de leur environnement naturel. De préférence, les polynucléotides de la présente invention peuvent être préparés par les techniques classiques de biologie moléculaire telles que
25 décrites par Sambrook et al. (voir Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 1989) ou par synthèse biochimique.

Dans un premier mode de réalisation, l'invention concerne un polynucléotide comprenant une séquence de régulation promotrice de plante de la SEQ ID No.1.

30 Dans un autre mode de réalisation, l'invention a également pour objet des polynucléotides comprenant un polynucléotide choisi parmi les polynucléotides suivants:

a) un polynucléotide capable de s'hybrider de manière sélective au polynucléotide de la SEQ ID No.1;

b) un polynucléotide homologue au polynucléotide de la SEQ ID No. 1.

Par " homologue " on entend selon l'invention un polynucléotide présentant une ou plusieurs modifications de séquence par rapport à la séquence de référence. Ces modifications peuvent être des délétions, des additions ou des substitutions d'un ou plusieurs nucléotides de la séquence de référence. De manière avantageuse, le pourcentage d'homologie sera d'au moins 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% et de préférence d'au moins 98% et plus préférentiellement d'au moins 99% par rapport à la séquence de référence. Les méthodes de mesure et d'identification des homologies entre les séquences d'acides nucléiques sont bien connues de l'homme du métier. On peut employer par exemple les programmes PILEUP ou BLAST (notamment Altschul et al., J.Mol.Evol. 36:290-300, 1993; Altschul et al., J.Mol.Biol. 215 :403-10, 1990). De préférence on utilisera les paramètres par défaut. L'invention concerne donc des polynucléotides comprenant des polynucléotides présentant au moins 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% et de préférence au moins 98% et plus préférentiellement au moins 99% d'homologie avec le polynucléotide de la SEQ ID No. 1. De préférence l'invention concerne un polynucléotide comprenant un polynucléotide d'au moins 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 nucléotides présentant au moins 70 %, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% et de préférence au moins 98% et plus préférentiellement au moins 99% d'homologie avec le polynucléotide de SEQ ID No. 1. De préférence, les polynucléotides homologues à un polynucléotide de référence conservent la fonction de la séquence de référence.

Par " séquence capable de s'hybrider de manière sélective ", on entend selon l'invention les séquences qui s'hybrident avec la séquence de référence à un niveau supérieur au bruit de fond de manière significative. Le niveau du signal généré par l'interaction entre la séquence capable de s'hybrider de manière sélective et les séquences de référence est généralement 10 fois, de préférence 100 fois plus intense que celui de l'interaction des autres séquences d'ADN générant le bruit de fond. Les conditions d'hybridation stringentes permettant une hybridation sélective sont bien connues de l'homme du métier. En général la température d'hybridation et de lavage est inférieure d'au moins 5°C au T_m de la séquence de référence à un pH donné et pour une force ionique donnée. Typiquement la température d'hybridation est d'au moins 30°C

- pour un polynucléotide de 15 à 50 nucléotides et d'au moins 60°C pour un polynucléotide de plus de 50 nucléotides. A titre d'exemple, l'hybridation est réalisée dans le tampon suivant: 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.02% BSA, 500 µg/ml denatured salmon sperm DNA. Les lavages sont
- 5 par exemple réalisés successivement à faible stringence dans un tampon 2X SSC, 0,1%SDS, à moyenne stringence dans un tampon 0,5X SSC, 01%SDS et à forte stringence dans un tampon 0,1X SSC, 0,1%SDS. L'hybridation peut bien entendu être effectuée selon d'autres méthodes usuelles bien connues de l'homme du métier (voir notamment Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 1989).
- 10 L'invention concerne donc des polynucléotides comprenant un polynucléotide capable de s'hybrider de manière sélective avec le polynucléotide de la SEQ ID No. 1. De préférence, l'invention concerne un polynucléotide comprenant un polynucléotide d'au moins 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 nucléotides capable de s'hybrider de manière sélective avec le polynucléotide de la SEQ ID No. 1. De préférence, les
- 15 polynucléotides s'hybrident de manière sélective à un polynucléotide de référence conservent la fonction de la séquence de référence.

Dans un troisième mode de réalisation, l'invention concerne un fragment biologiquement actif du polynucléotide selon la SEQ ID No. 1.

- Par "fragment biologiquement actif" on entend ci-dessus un polynucléotide ayant
- 20 une activité promotrice ou une activité de régulation de la transcription notamment en réponse à des agressions par un agent pathogène ou par un autre agent inducteur d'une réaction de défense des plantes.

- Dans un mode de réalisation préféré, les polynucléotides de la présente invention comprennent au moins une boîte CAAT (positions 2055-2059 de la SEQ ID No.1) et au
- 25 moins une boîte TATA (positions 2178-2185 de la SEQ ID No. 1). De préférence, les polynucléotides selon l'invention comprennent également des éléments régulateurs, en particulier au moins une boîte G (positions 1989-1992, 1847-1850, 1636-1639, 1162-1165, 1038-1041, 189-192, 67-70 de la SEQ ID No.1) et/ou au moins une boîte ERE.

- Préférentiellement, les polynucléotides de la présente invention comprennent au
- 30 moins un polynucléotide choisi parmi les polynucléotides suivants:

a) un polynucléotide dont la séquence est comprise entre la position 1938 et la position 1945 de la SEQ ID No. 1; et

b) un polynucléotide dont la séquence est comprise entre la position 576 et la position 584 de la SEQ ID No. 1; et

c) un polynucléotide dont la séquence est comprise entre la position 513 et la position 520 de la SEQ ID No. 1.

- 5 Dans un mode de réalisation préféré, les polynucléotides de la présente invention comprennent un polynucléotide dont la séquence est comprise entre la position 821 et la position 875 de la SEQ ID No.1.

Dans un mode de réalisation préféré, les polynucléotides de la présente invention ont une activité promotrice dans les plantes.

- 10 Avantageusement, l'activité promotrice n'est pas détectée dans les plantes saines.

- Dans un mode de réalisation, les polynucléotides de la présente invention ont une activité promotrice dans certains organes des plantes saines importants pour la survie et la persistance de la plante. En particulier, l'activité promotrice des polynucléotides de la présente invention est détectée dans les cotylédons de l'embryon, dans l'hypocotyle et les
15 feuilles cotylédonaire au cours de la germination, dans la région du collet et au niveau des pétioles des feuilles de plantes en croissance et de plantes adultes, ainsi que dans les organes reproducteurs de la fleur et dans les pétales de la fleur. Ce profil expression tissulaire dans des organes essentiels pour la survie et la persistance de la plante est en accord avec un rôle de défense et de protection. En particulier, l'activité est détectée
20 dans les zones d'abscission des feuilles et des fleurs.

- De préférence, les polynucléotides de la présente invention ont une activité promotrice et régulatrice de l'expression en relation avec les mécanismes de défense des plantes et avec la pathogénèse. Préférentiellement, cette activité promotrice est induite en réponse à un agent inducteur et notamment en réponse à une agression par un
25 pathogène ou par un agent chimique. Par "agent inducteur" on entend tout agent chimique ainsi que tout agent produit par un pathogène susceptible de provoquer une réaction de défense des plantes. On citera notamment les éliciteurs chimiques ainsi que les éliciteurs d'agents pathogènes tels que les bactéries, les virus et les champignons. Par agent inducteur on entend également tout agent pathogène susceptible de provoquer une
30 réaction de défense de la plante.

Avantageusement, l'activité promotrice des polynucléotides de la présente invention est induite consécutivement à des traitements éliciteurs, à l'agression par des agents pathogènes notamment bactérien, fongique ou viral, et en particulier par

l'infection par *Phytophthora*. De préférence, cette induction est très précoce et est mesurable avant l'apparition des nécroses ou des symptômes. Préférentiellement, l'amplitude d'induction est élevée, au niveau quantitatif on mesure, après 12 heures, une induction d'un facteur d'au moins 15, 25, 50, 75 et de préférence d'un facteur 100.

- 5 De préférence, l'activité promotrice des polynucléotides de la présente invention est induite par des agents inducteurs, en particulier par le traitement par le MeJa (méthyle jasmonate), l'ACC (acide 1-aminocyclopropane-1 carboxylique) et par les métaux lourds.

- Avantageusement, l'activité promotrice des polynucléotides selon la présent
10 invention est induite par le λ -carraghénane, un polysaccharide extrait d'algues rouges du genre *Gigartina* (Mercier et al., New Phytologist 149:43-51, 2001). Avantageusement, cette induction est obtenue par traitement des tissus foliaires par infiltration.

- Les techniques permettant d'évaluer l'activité promotrice d'un polynucléotide sont bien connues de l'homme du métier. Ces techniques impliquent classiquement
15 l'utilisation d'un vecteur d'expression comprenant dans le sens de la transcription le polynucléotide à tester et un gène rapporteur (voir Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 1989).

Cassettes d'expression

- Selon un mode de réalisation de l'invention, les polynucléotides ayant une
20 activité promotrice ou régulatrice selon l'invention sont insérés dans une cassette d'expression en utilisant des techniques de clonage bien connues de l'homme du métier. Cette cassette d'expression comprend les éléments nécessaires à la transcription et à la traduction des séquences codant pour un gène rapporteur ou un polypeptide d'intérêt. Les polynucléotides de la présente invention ayant une activité promotrice et/ou
25 régulatrice de l'expression sont donc avantageusement utilisés pour exprimer un gène hétérologue dans un organisme hôte et notamment dans les cellules végétales ou dans les plantes. Avantageusement, cette cassette d'expression comprend à la fois des éléments permettant de faire produire un polypeptide par une cellule hôte et des éléments nécessaires à la régulation de cette expression.

- 30 La présente invention a donc également pour objet des cassettes d'expression fonctionnelles dans les cellules végétales ou les plantes comprenant dans le sens de la transcription, une séquence de régulation promotrice en 5', une séquence codante et une séquence de régulation en 3', dans laquelle la séquence de régulation promotrice en 5'

comprend un polynucléotide choisi parmi les polynucléotides suivants:

- a) un polynucléotide comprenant une séquence de régulation promotrice de plante caractérisé en ce qu'il comprend le polynucléotide de la SEQ ID No. 1; et
- b) un polynucléotide capable de s'hybrider de manière sélective au polynucléotide de la
5 SEQ ID No.1; et
- c) un polynucléotide homologue au polynucléotide de la SEQ ID No. 1; et
- d) un polynucléotide selon b) ou c) ayant une activité promotrice dans les cellules végétales et les plantes;
- e) un polynucléotide selon b), c) ou d) dont l'activité promotrice est induite en réponse à
10 un agent inducteur et notamment en réponse à une agression par un pathogène.

Tout gène d'intérêt peut être exprimé dans un organisme hôte sous le contrôle d'un promoteur selon l'invention. De préférence, les polynucléotides selon la présente invention ayant une activité promotrice sont utilisés pour l'expression d'un gène hétérologue dans des cellule de plante ou dans une plante.

- 15 Avantageusement, la séquence codante comprend une séquence codant pour un gène rapporteur ou une séquence codant pour une protéine ou un polypeptide d'intérêt. Parmi les gènes rapporteurs on citera notamment les gènes rapporteurs GUS (β -glucuronidase), GFP (green fluorescent protein), LUC (luciférase), CAT (chloramphenicol transferase) ou β -galactosidase (lacZ).

- 20 De préférence, la protéine d'intérêt est une protéine conférant aux plantes des propriétés de résistance aux maladies ou aux insectes.

Dans un mode de réalisation préféré, la protéine d'intérêt est choisi parmi les éliciteurs fongiques ou les peptides lytiques.

- 25 Au regard du mode d'induction du promoteur selon l'invention, la protéine d'intérêt est avantageusement une protéine conférant aux plantes des propriétés de résistance aux maladies et aux pathogènes.

- 30 Parmi les protéines ou peptides d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux maladies on citera notamment les chitinases, les glucanases, l'oxalate oxydase, toutes ces protéines et leurs séquences codantes étant largement décrites dans la littérature, ou encore les peptides antibactériens et/ou antifongiques, en particulier les peptides de moins de 100 acides aminés riches en cystéines comme les thionines ou défensines de plantes, et plus particulièrement les peptides lytiques de toutes origines comprenant un ou plusieurs ponts disulfures entre les cystéines et des régions

comprenant des acides aminés basiques, notamment les peptides lytiques suivants : l'androctonine (WO 97/30082 et PCT/FR98/01814, déposée le 18 août 1998) ou la drosomicine (PCT/FR98/01462, déposée le 8 juillet 1998).

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, la protéine ou peptide
5 d'intérêt est choisi parmi les peptides éliciteurs fongiques, en particulier les élicitines (Kamoun et al., Mol. Plant microb. Interact., 6:15-25, 1993 ; Panabières et al., Mol. Plant Microb. Interact., 8, 1995).

Parmi les protéines d'intérêt conférant de nouvelles propriétés de résistance aux insectes, on citera plus particulièrement les protéines *Bt* largement décrites dans la
10 littérature et bien connues de l'homme du métier. On citera aussi les protéines extraites de bactéries comme *Photorabdus* (WO 97/17432 & WO 98/08932).

Les cassettes d'expression, selon la présente invention, peuvent en outre inclure toute autre séquence nécessaire à l'expression du gène d'intérêt, comme par exemple des éléments de régulation ou des séquences signal permettant l'adressage du polypeptide
15 d'intérêt.

Les techniques de construction de ces cassettes d'expression sont largement décrites dans la littérature (voir notamment Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 1989).

Certains éléments des cassettes d'expression selon l'invention sont illustrés ci-
20 dessous à titre non limitatif.

Comme séquence de régulation en 5', on peut utiliser les polynucléotides selon l'invention seuls ou associés à au moins une partie d'un promoteur d'un gène s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur s'exprimant notamment dans les feuilles des plantes, comme par exemple des promoteurs dits
25 constitutifs d'origine bactérienne, virale ou végétale ou encore des promoteurs dits lumière dépendants comme celui d'un gène de la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (RuBisCO) de plante ou tout promoteur convenable connu pouvant être utilisé. Parmi les promoteurs d'origine végétale on citera les promoteurs d'histone tels que décrits dans la demande EP 0 507 698, ou le promoteur d'actine de riz
30 (US 5,641,876). Parmi les promoteurs d'un gène de virus de plante, on citera celui de la mosaïque du chou fleur (CAMV 19S ou 35S), ou le promoteur du circovirus (AU 689 311).

On peut encore utiliser les polynucléotides selon l'invention en association avec

au moins une partie d'un promoteur spécifique de régions ou de tissus particuliers des plantes, et plus particulièrement des promoteurs spécifiques des graines (Datla, R. et al., *Biotechnology Ann. Rev.*, 3:269-296, 1997), notamment les promoteurs de la napine (EP 255 378), de la phaseoline, de la glutenine, de l'héliantinine (WO 92/17580), de l'albumine (WO 98/45460) ou de l'oélosine (WO 98/45461).

Dans les cassettes d'expression de la présente invention on peut utiliser toute séquence de régulation permettant d'augmenter le niveau d'expression de la séquence codante insérée dans ladite cassette d'expression. Selon l'invention, on peut notamment utiliser, en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"). Parmi les séquences leader dérivées de virus on citera par exemple l'activateur du virus de la mosaïque du tabac (TMV) décrit dans la demande WO 87/07644, ou l'activateur du virus etch du tabac (TEV). Différentes séquences dérivées d'introns de plantes peuvent également être utilisées pour augmenter le niveau d'expression du gène d'intérêt notamment chez les plantes monocotylédones. On citera par exemple l'intron I du gène de maïs AdhI (Callis et al., *Genes Develop.*, 1:1183-1200, 1987).

Une grande variété de séquences terminatrices sont utilisables dans les cassettes d'expression selon l'invention. Ces séquences permettent la terminaison de la transcription et la polyadénylation de l'ARNm. Toute séquence terminatrice fonctionnelle dans l'organisme hôte sélectionné peut être utilisée. Pour l'expression dans les plantes on peut notamment utiliser le terminateur *nos* d'*Agrobacterium tumefaciens*, ou encore des séquences terminatrices d'origine végétale, comme par exemple le terminateur d'histone (voir EP 0 633 317), le terminateur CaMV 35 S et le terminateur *tml*. Ces séquences terminatrices sont utilisables dans les plantes monocotylédones et dicotylédones.

La présente invention a également pour objet un polynucléotide comprenant une cassette d'expression selon l'invention et notamment un vecteur comprenant une cassette d'expression selon l'invention.

Avantageusement les cassettes d'expression selon la présente invention sont insérées dans un vecteur pour leur répllication ou pour la transformation d'un organisme hôte.

Vecteurs

La présente invention concerne également des vecteurs de transformation ou d'expression comprenant au moins un polynucléotide ou une cassette d'expression selon la présente invention. Les vecteurs de la présente invention sont notamment utilisés pour transformer un organisme hôte et pour exprimer un polypeptide d'intérêt dans ledit

5 organisme hôte. L'organisme hôte est par exemple une bactérie, une levure, un champignon, une cellule de plante ou une plante. Ce vecteur peut notamment être constitué par un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus dans lequel est inséré un polynucléotide ou une cassette d'expression selon l'invention. De manière générale, tout vecteur capable de se maintenir, de s'autorépliquer ou de se propager dans

10 une cellule hôte afin d'induire l'expression d'un polynucléotide ou d'un polypeptide peut être utilisé.

Les techniques de construction de ces vecteurs et les techniques d'insertion d'une séquence appropriée dans ces vecteurs sont largement décrites dans la littérature (voir notamment Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 1989).

15 Avantageusement, les vecteurs selon l'invention comprennent au moins une origine de répllication. De manière préférée, les vecteurs de l'invention comprennent également au moins un marqueur de sélection et de préférence un marqueur de sélection utilisable dans les cellules végétales ou dans les plantes. Parmi les marqueurs de sélection, on peut citer les gènes de résistance aux antibiotiques tel que le gène *nptII*

20 pour la résistance à la kanamycine (Bevan et al., Nature 304:184-187, 1983) et le gène *hph* pour la résistance à l'hygromycine (Gritz et al., Gene 25:179-188, 1983). On citera également les gènes de tolérance aux herbicides tel que le gène *bar* (White et al., NAR 18:1062, 1990) pour la tolérance au bialaphos, le gène EPSPS (US 5,188,642) pour la tolérance au glyphosate ou encore le gène HPPD (WO 96/38567) pour la tolérance aux

25 isoxazoles. On pourra également utiliser les gènes codant pour des enzymes rapporteurs facilement identifiables comme l'enzyme GUS ou des gènes codant pour des pigments et des enzymes régulant la production de pigments dans les cellules transformées. De tels gènes marqueurs de sélection sont notamment décrits dans les demandes de brevet EP 242 236, EP 242 246, GB 2 197 653, WO 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567

30 ou WO 97/04103.

Avantageusement, ces vecteurs sont utilisés pour la transformation d'un organisme hôte. L'homme du métier choisira les vecteurs de transformation appropriés notamment

en fonction de l'organisme hôte à transformer et en fonction de la technique de transformation mise en œuvre.

Pour la transformation des cellules végétales ou des plantes, il s'agira notamment d'un virus qui peut être employé pour la transformation des plantes développées et
5 contenant en outre ses propres éléments de réplication et d'expression. De manière préférentielle, le vecteur de transformation des cellules végétales ou des plantes selon l'invention est un plasmide.

De nombreux vecteurs ont été développés pour la transformation des plantes avec *Agrobacterium tumefaciens*. D'autres vecteurs sont utilisés pour les techniques de
10 transformation ne reposant pas sur l'utilisation d'*Agrobacterium*. Ces vecteurs sont bien connus de l'homme du métier et largement décrits dans la littérature.

Transformation

L'invention a encore pour objet un procédé de transformation des organismes hôtes, en particulier des cellules végétales avec un polynucléotide, une cassette
15 d'expression ou un vecteur de transformation ou d'expression selon l'invention. L'invention concerne également un procédé de transformation des cellules végétales dans lequel on intègre dans le génome des dites cellules végétales au moins un polynucléotide, une cassette d'expression et/ou un vecteur selon l'invention.

Selon la présente invention la transformation de l'organisme hôte peut être
20 obtenue par tout moyen connu approprié, les techniques de transformation et notamment de transformation des plantes sont amplement décrites dans la littérature spécialisée.

Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes, on citera notamment les brevets et demandes de brevet suivants: US 4,459,355, US 4,536,475, US 4,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662,
25 EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

Certaines techniques utilisent *Agrobacterium* notamment pour la transformation
30 des dicotylédones. Une série de méthodes consistent à utiliser comme moyen de transfert dans la plante un gène chimère inséré dans un plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* ou Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*. D'autres méthodes consistent à bombardier des cellules, des protoplastes ou des tissus avec des particules auxquelles

sont accrochées les séquences d'ADN. D'autres méthodes peuvent également être utilisées telles que la micro-injection ou l'électroporation, ou encore la précipitation directe au moyen de PEG.

L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de l'organisme hôte, en particulier de la cellule végétale ou de la plante.

La présente invention a également pour objet des cellules végétales et des plantes obtenus par les procédés de transformation décrits ci-dessus.

Organismes hôtes

La présente invention concerne également un organisme hôte transformé avec un polynucléotide, une cassette d'expression ou un vecteur selon l'invention.

Par organisme hôte, on entend en particulier selon l'invention tout organisme mono ou pluricellulaire, inférieur ou supérieur, en particulier choisi parmi les bactéries, les levures, les champignons ou les cellules végétales et les plantes. De manière avantageuse, les bactéries sont choisies parmi *Escherichia coli*, les levures sont choisies parmi *Pichia pastoris* et *Saccharomyces cerevisiae*, les champignons sont choisis parmi *Aspergillus niger*. De manière préférentielle, l'organisme hôte est une cellule végétale ou une plante.

Dans un mode de réalisation préféré, l'invention a pour objet des cellules végétales transformées ou des plantes transformées comprenant au moins un polynucléotide, une cassette d'expression et/ou un vecteur selon l'invention..

Par "cellule végétale", on entend selon l'invention toute cellule issue d'une plante et pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

On entend par "plante" selon l'invention, tout organisme multicellulaire différencié capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones, plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le maïs, le blé, l'orge, le sorgho, le colza, le soja, le riz, la canne à sucre, la betterave, le tabac, le coton,, le tournesol, le trèfle etc.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'organisme hôte comprend au moins un autre gène hétérologue codant pour un peptide, un polypeptide ou une protéine d'intérêt. Le polynucléotide comprenant un polynucléotide selon l'invention et le ou les autres gènes hétérologues peuvent avoir été introduits dans l'organisme hôte simultanément au moyen d'un même vecteur les comprenant, ou au

moyen de plusieurs vecteurs, ou de manière séquentielle au moyen de plusieurs vecteurs, ou encore par croisement de plusieurs organismes hôtes, chacun comprenant un gène hétérologue.

Par gène hétérologue, on entend selon l'invention tout gène introduit de manière artificielle dans l'organisme hôte, et plus particulièrement intégré de manière artificielle dans son génome, les méthodes permettant cette introduction ou intégration pouvant être celles décrites précédemment.

Les plantes transformées selon l'invention peuvent ainsi contenir d'autres gènes d'intérêt, conférant aux plantes de nouvelles propriétés agronomiques. Parmi les gènes conférant de nouvelles propriétés agronomiques aux plantes transformées, on peut citer les gènes conférant une tolérance à certains herbicides, ceux conférant une tolérance à certains insectes, ceux conférant une tolérance à certaines maladies. De tels gènes sont notamment décrits dans les demandes de brevet WO 91/02071 et WO 95/06128. On peut également citer les gènes modifiant la constitution des plantes modifiées, en particulier la teneur et la qualité de certains acides gras essentiels (EP 666 918) ou encore la teneur et la qualité des protéines, en particuliers dans les feuilles et/ou les graines desdites plantes. On citera en particulier les gènes codant pour des protéines enrichies en acides aminés soufrés (WO 98/20133 ; WO 97/41239 ; WO 95/31554 ; WO 94/20828; WO 92/14822

Ces autres gènes d'intérêt peuvent être combinés au gène chimère selon l'invention soit par croisement conventionnel de deux plantes contenant chacune l'un des gènes (la première le gène chimère selon l'invention et la seconde le gène codant pour la protéine d'intérêt) soit en effectuant la transformation de cellules végétales d'une plante contenant le gène codant pour la protéine d'intérêt avec le gène chimère selon l'invention.

La présente invention a encore pour objet les plantes contenant des cellules transformées telles que définies ci-dessus, en particulier les plantes régénérées à partir des cellules transformées et leur descendance. La régénération est obtenue par tout procédé approprié qui dépend de la nature de l'espèce, comme par exemple décrit dans les références ci-dessus.

La présente invention concerne aussi les plantes génétiquement modifiées dans le génome desquelles un polynucléotide ou une cassette d'expression selon l'invention sont intégrés de manière stable et transmissible par reproduction sexuée.

La présente invention concerne également des plantes obtenues par croisement des plantes régénérées ci-dessus avec d'autres plantes. Elle concerne aussi les graines de plantes transformées.

- 5 Les exemples ci-après permettent d'illustrer l'invention, sans toutefois chercher à en limiter la portée.

Toutes les méthodes ou opérations décrites ci-dessous dans ces exemples sont données à titre d'exemples et correspondent à un choix, effectué parmi les différentes méthodes disponibles pour parvenir au même résultat. Ce choix n'a aucune incidence sur
10 la qualité du résultat et par conséquent, toute méthode adaptée peut être utilisée par l'homme de l'art pour parvenir au même résultat. La plupart des méthodes d'ingénierie des fragments d'ADN sont décrites dans "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes 1 et 2, Ausubel F.M. et al. ou dans Sambrook et al 1989.

15

Description des figures

Figure 1: Activité glucuronidase des plantes P1LOX après infiltration d'éliciteur de *Ppn*, dans la zone infiltrée.

- 20 A: L'activité enzymatique a été dosée (en pmol MU/h/μg prot) dans des disques foliaires prélevés dans des zones infiltrées par l'éliciteur *Ppn*, aux temps indiqués (4, 8, 12, 24 heures). Les mesures ont été effectuées pour 3 plantes d'une même lignée transgénique (1, 2, 3). Deux contrôles ont été réalisés sur des plantes après infiltration d'eau (4) et sur des plantes témoins sans infiltration (5).
- 25 B: L'activité enzymatique a été dosée (en pmol MU/h/μg prot) dans des disques foliaires prélevés dans des zones infiltrées par l'éliciteur *Ppn*, aux temps indiqués (4, 8, 12, 24 heures). Les mesures ont été effectuées pour 3 lignées transgéniques différentes (1: lignée 4, 2: lignée 5, 3: lignée 13).

- 30 **Figure 2: Activité glucuronidase des plantes P1LOX après infiltration d'éliciteur de *Ppn*, à distance de la zone infiltrée.**

L'activité enzymatique a été dosée (en pmol MU/h/μg prot) dans des disques foliaires prélevés dans la moitié non infiltrée de feuilles traitées par éliciteur de *Ppn*, aux temps

indiqués (0, 3, 7 jours). La croix indique la mort des tissus dans la zone infiltrée. Des disques foliaires ont été prélevés dans la zone infiltrée (1), dans la zone proche (2), dans la zone éloignée (3) et dans une feuille supérieure (4).

5 **Figure 3: Activité glucuronidase dans les plantes P1LOX inoculées par *Ppn* race 0.**

L'activité glucuronidase a été mesurée (en pmol MU/h/μg prot) dans les racines de plantes inoculées, aux temps indiqués (5, 12, 24, 48 heures et 3 jours). La lignée 5 a été inoculée avec de l'eau (2) et avec *Ppn* race 0 (1). La lignée 21 a été inoculée avec de l'eau (4) et avec *Ppn* race 0 (3).

10

Figure 4: Effet du MeJa (méthyl jasmonate) sur l'activité glucuronidase des plantes P1LOX.

L'activité glucuronidase a été mesurée dans les plantes 24 heures après traitement par le MeJa (250μM). Pour chaque mesure, l'activité spécifique des plantes traitées a été
15 rapportée à celle de plantes témoin traitées avec de l'éthanol, témoins auxquels la valeur 1 a été attribuée. Les histogrammes représentent l'activité spécifique rapporté à celle des témoins. Les mesures réalisées sur trois lignées de plantes P1LOX sont représentées (lignées 5, 9 et 13). Deux essais (1) et (2) ont été réalisés pour chaque lignée.

20

EXEMPLES

Exemple 1: Obtention d'un clone génomique de tabac renfermant la région promotrice du gène LOX induit par la pathogenèse

Description des sondes utilisées

25 TL-J2 est un ADN complémentaire de 2888 pb, correspondant à un gène de LOX de tabac induit par la pathogenèse. L'obtention de cet ADN complémentaire est décrite par Véronési et al. (Plant Physiol., 108:1342, 1995), sa séquence est déposée dans GenBank sous le numéro d'accèsion X84040. Un fragment EcoR1 de 1409 pb, correspondant aux nucléotides 1222 à 2630 de TL-J2, nommé TL-35, a également été utilisé.

30 ***Description de la banque génomique de tabac utilisée***

La banque génomique de tabac a été acquise auprès de la société Clontech (4030 Fabian Way, Palo Alto, CA 94303-4607, USA, référence du produit FL1071d). Il s'agit d'une banque réalisée par digestion partielle par l'enzyme *Mbo*I d'ADN isolé de plantes

de tabac *Nicotiana tabacum*, cv. Xanthi-nc, récoltées 30 jours après émergence, puis sélection de fragments d'une taille comprise entre 8 et 22kb et insertion des fragments obtenus au site *Bam*H1 du vecteur EMBL3.

Clones génomiques LOX de tabac

- 5 Le criblage de la banque de tabac à l'aide de l'ADN complémentaire TL-35 a conduit à l'isolement et à la purification d'un clone de bactériophage nommé A1, présentant une forte hybridation à la sonde TL-35. Une étape de sous-clonage de l'ADN phagique a permis d'isoler et de séquencer des fragments du clone A1 qui s'hybridaient à la sonde LOX. L'analyse des séquences obtenues a montré que l'insert A1 renfermait
- 10 la partie 3' terminale du gène *Nt*LOX1, et en particulier les nucléotides 260 à 2888 de l'ADNc TL-J2 répartis en 8 exons séparés par 7 introns. L'obtention d'un deuxième clone génomique de tabac chevauchant avec le clone A1 et renfermant la région 5' terminale du gène *Nt*LOX1, est décrite dans la thèse de Doctorat de l'Université de Paris XI- Orsay de Iann Rancé (1997, pages 46 à 48). Ce clone a été nommé 2A5. Le
- 15 séquençage partiel de l'ADN phagique a montré que le clone 2A5 contenait les nucléotides 1 à 259 de l'ADNc TL-J2, soit la région non traduite de l'extrémité 5' terminale du gène et la totalité de l'exon 1. L'insert 2A5 est chevauchant avec le clone A1 sur 2557 nt, qui correspondent aux nucléotides 297 à 2853 de la séquence de l'intron 1 (d'une taille totale de 3798 pb). Une région de 2330 pb contenant l'extrémité 5'
- 20 terminale du gène LOX et les régions en amont a été séquencée et dénommée P1LOX. La séquence de ce fragment est présentée dans la SEQ ID No. 1.

Isolement d'un fragment promoteur

- Le fragment d'ADN P1LOX de 2330 pb contenant les nucléotides 728 à 3047 du clone génomique 2A5 a été isolé par amplification en chaîne (PCR). Ce fragment
- 25 contient la boîte TATA putative et environ 2.2 kb de séquence en amont qui incluent potentiellement la majorité des éléments *cis*-régulateurs. La région 3' terminale du fragment contient les 88 nucléotides de la région leader de l'ARN LOX, le codon initiateur ATG de la traduction du gène LOX ainsi que les nucléotides codant pour les 6 premiers acides aminés de la LOX de tabac. Les séquences des deux amorces utilisées
- 30 dans la réaction PCR sont indiquées ci-dessous et il faut noter l'insertion du site *Xba*I dans l'amorce sens et du site *Sma*I dans l'amorce anti-sens (caractères soulignés).

Amorce Sens: 5' CCC TTT CTA GAC CAT TTA TTT CCC 3'

Amorce Anti-Sens: 5' CTG TGA TTC CCG GGA CAA TCT TCT 3'

La réaction d'amplification contenait 300 ng d'ADN phagique du clone 2A5, 25 picomoles de chacune des deux amorces, 200 μ M dNTP et 1 unité de *Vent* polymérase (New England) et son tampon de réaction. L'amplification s'est déroulée sur 20 cycles et la séquence du fragment obtenu a été vérifiée.

5 *Analyse de la séquence du fragment cloné*

Une comparaison de séquence entre le promoteur P1LOX de tabac et la banque de données d'acides nucléiques GenBank ne révèle pas d'homologies significatives avec d'autres promoteurs. En particulier, un alignement de séquence entre le promoteur LOX de tabac et un fragment de 700 pb en amont de la séquence transcrite de la LOX1 d'*Arabidopsis thaliana*, (Melan *et al.*, Biochem. Biophys. Acta, 1210:377-380, 1994) ou le promoteur LOX1 de l'orge, inductible par le MeJa, ne met pas en évidence de régions conservées. Cette analyse permet cependant de détecter dans le promoteur P1LOX une séquence de 50 pb (position 821-875 de la SEQ ID No.1), en amont de la boîte TATA, qui présente 90% d'homologie avec une région de l'intron 2 d'un gène de tabac codant pour une phenylalanine ammonia-lyase ainsi qu'avec une région de l'intron 5 du gène *rbvmtT* de tabac codant pour la méthyl-transférase de la grande sous-unité de la Rubisco.

Des éléments régulateurs potentiels, impliqués dans la régulation par le méthyl jasmonate ou par les éliciteurs, ont aussi été recherchés dans la séquence du promoteur P1LOX de tabac.

De nombreux promoteurs induits par le méthyl-jasmonate (MeJa) tels que le promoteur de la chalcone synthase du persil (Schulze-Lefert *et al.*, EMBO J., 8:651-656, 1989), le promoteur du gène codant pour la protéine de réserve (VSP) du soja (Mason *et al.*, Plant Cell, 5:241-251, 1993) ou le promoteur du gène de l'inhibiteur de protéinase II de la pomme de terre (Kim *et al.*, Plant Physiol., 99:571-576, 1992) contiennent dans leur séquence une boîte G (CACGTG) essentielle pour l'induction. Un motif TGACG analogue à l'élément *as1* identifié dans le promoteur 35S du CaMV est aussi impliqué dans la réponse au MeJa du promoteur de la lipoxigénase LOX 1 de l'orge (Rouster *et al.*, Plant J., 11:513-523, 1997). L'analyse de la séquence du promoteur LOX de tabac ne révèle pas de motifs TGACG ou de boîtes G consensus. Plusieurs motifs ACGT pouvant être assimilés à des boîtes G peu conservées sont cependant identifiés dans le promoteur.

Plusieurs éléments de séquence impliqués dans la réponse à des éliciteurs ont aussi été identifiés dans différents promoteurs de plantes. On trouve principalement des boîtes ERE (AATTGACC) pour *Elicitor Responsive Element*, identifiées en particulier dans le promoteur PR1 du gène PRm du maïs (Raventos *et al.*, Plant J., 7:147-155, 1995) et dans le promoteur PR1 de persil (Rushton *et al.*, EMBO J., 15:5690-5700, 1996). Des boîtes EIRE (GTCAG) pour *Elicitor Responsive Element* sont aussi impliquées dans l'activation par les éliciteurs comme montré en particulier pour le promoteur du gène de tabac codant une chitinase de classe I (Fukuda *et al.*, Plant Mol. Biol., 24:485-493, 1994). Récemment, une boîte GCC appelée aussi élément JERE (*Jasmonic acid and Elicitor-Responsive Element*) impliqué à la fois dans l'activation par les éliciteurs et l'acide jasmonique a été caractérisée dans le promoteur du gène codant la strictosidine synthase de *Catharanthus roseus* (Menke *et al.*, EMBO J., 18:4445-4463 1999). La recherche de ces éléments dans la séquence du promoteur de la LOX de tabac n'a pas permis d'identifier de boîtes GCC ou EIRE. Trois motifs analogues à la boîte ERE peuvent cependant être localisés en amont de la boîte TATA.

Exemple 2: Obtention de la construction de fusion P1LOX::GUS

Après une réaction de digestion par les enzymes *Xba*I et *Sma*I, le fragment promoteur amplifié a été cloné aux mêmes sites dans le vecteur pBI101 (Clontech). Le clonage est réalisé de manière à ce que le codon ATG du gène LOX soit dans le même cadre de lecture que la séquence codante du gène rapporteur *uidA*. La construction chimérique ainsi obtenue est appelée P1LOX::GUS.

Exemple 3: Transformation génétique du tabac

La construction P1LOX::GUS a été transférée par électroporation dans des Agrobactéries de souche LBA4404. Les bactéries recombinantes obtenues ont ensuite été utilisées pour l'infection de disques foliaires de tabac, *Nicotiana tabacum*, lignées 46.8 et 49.10 suivant des procédures standard (Horsch *et al.*, Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers, 1988). Les lignées de tabacs utilisées sont quasi-isogéniques et se différencient par la présence dans la lignée 46.8 d'un locus de résistance à la race 0 de *Ppn*.

Les plantes régénérées sur un milieu de Murashige et Skoog (MS) contenant 150 µg/ml de Kanamycine sont placées en chambre de culture puis en serre pour l'obtention des graines T1. La présence de la cassette d'expression promoteur LOX- gène *uidA* ainsi que le nombre de copies du transgène dans le génome des plantes régénérées ont été

déterminés par des expériences d'hybridation ADN/ADN (Southern). Les résultats montrent que les transformants primaires de la lignée 46.8 contiennent de 1 à 5 copies du transgène. Les plantes 46.8 possédant un faible nombre de copies (monocopie ou deux copies) ont été sélectionnées pour l'étude du promoteur LOX. Pour ces lignées, les
5 graines T1 issues de l'autofécondation des transformants primaires ont été mises à germer sur milieu sélectif et les plantes obtenues ont été utilisées pour l'étude de l'activité du promoteur.

L'activité du promoteur P1LOX a été caractérisée à partir de trois types d'expériences mettant en jeu :

- 10
- des infiltrations de feuilles avec des préparations d'éliciteurs
 - des inoculations racinaires par *Phytophthora parasitica nicotianae* (Ppn).
 - des tests d'induction sur jeunes plantes permettant d'analyser l'influence de diverses molécules sur la régulation de l'activité du promoteur.

Les expériences ont été réalisées avec des plantes transgéniques, de génération
15 T1, issues de lignées indépendantes et contenant une ou deux copies du transgène par génome.

Exemple 4: Détection et mesure de l'activité glucuronidase

La détection histo-chimique de l'activité GUS est réalisée essentiellement selon la méthode décrite par Jefferson et al. (EMBO J., 6:3901-3907, 1987). Des tissus sont
20 prélevés sur les plantes transgéniques et directement incubés à 37°C dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7 contenant 0.5 mM de sels de potassium de ferro et ferri cyanure, 1 mM de X-GLUC (Eurogentec); et 0,1 % Triton X100.

Après coloration, les échantillons sont placés dans une solution d'éthanol 70%, permettant d'éliminer les pigments chlorophylliens, puis observés pour analyse.

25 Le dosage de l'activité GUS est réalisé selon le protocole standard (Jefferson *et al.*, EMBO J., 6:3901-3907, 1987). Les échantillons récoltés sont broyés dans un tampon d'extraction pour obtenir un extrait protéique sur lequel est mesurée l'activité glucuronidase. La réaction enzymatique est réalisée pour 50 µL d'extrait en présence du substrat MUG (Sigma) à 1mM. L'apparition de méthyl-umbelliférone (MU) est mesurée
30 par dosage fluorométrique et les valeurs d'activité sont exprimées en picomoles de MU produites par heure et par µg de protéines. La quantité de protéines est évaluée par la méthode de Bradford (Biorad).

Exemple 5: Activité du promoteur P1LOX dans des plantes transgéniques au cours du développement

Cette étude a été réalisée essentiellement sur des plantes T1, issues de lignées transgéniques indépendantes, contenant une ou deux copies de la construction

- 5 PILOX::GUS. L'analyse de l'activité du gène rapporteur dans les parties florales n'a été effectuée que sur les transformants primaires.

On peut distinguer trois profils d'expression distincts au cours du développement.

Germination

- L'activité β -glucuronidase a été analysée dans de jeunes germinations récoltées à
10 différents stades de développement.

Stade 1: 5 jours après semis.

- La germination démarre par la sortie de la radicule à travers les téguments. On note à ce stade précoce une intense coloration limitée dans une zone circulaire autour de la radicule à l'endroit où elle émerge des téguments de la graine. Aucune coloration n'est
15 détectée ailleurs sur la radicule. L'expression GUS est localisée au niveau du collet mais les tissus internes des téguments, autour de la zone de sortie de la radicule, semblent aussi fortement colorés.

Stade 2: 7 jours après semis.

- On observe à ce stade une elongation de la radicule et de l'hypocotyle. Les
20 cotylédons sont généralement en dehors des téguments, qui pour leur part restent encore attachés à la plantule au niveau du collet. L'expression GUS est détectée au niveau du collet et de l'hypocotyle en elongation. Une expression forte est aussi visible sur les cotylédons. La coloration semble être localisée sur les cellules épidermiques mais des coupes histologiques seront nécessaires pour confirmer ce résultat. Aucune activité n'est
25 détectée dans les racines et il y a une délimitation nette au niveau du collet entre zone colorée et non colorée.

Stade 3: 10 jours après semis.

- On a un développement général des plantules avec une racine, un hypocotyle allongé et deux cotylédons développés. Une expression GUS résiduelle persiste dans les
30 cotylédons. L'intensité de cette coloration est variable selon les individus et diminue au cours du développement.

Stade Végétatif

L'analyse de l'expression du gène rapporteur dans les différents tissus de plantes

en croissance et de plantes adultes a montré une activité β -glucuronidase limitée à la région du collet ainsi qu'au niveau des pétioles des feuilles. Une expression GUS a été détectée au niveau du collet à tous les stades du développement analysés. L'analyse de coupes sur du matériel frais a montré que cette expression est localisée au niveau des
5 éléments conducteurs. Une coloration GUS est visible dans le cylindre central de la partie haute de la racine et dans les vaisseaux du phloème interne dans la partie basse de la tige. Une expression GUS a aussi été observée à la base des pétioles des feuilles. L'observation microscopique de coupes transversales au niveau des nœuds de la tige a montré que les cellules qui développent une coloration bleue appartiennent au
10 parenchyme cortical. Ces indications suggèrent que la zone colorée constitue la future zone d'abscission de la feuille. A l'exception de ces tissus, aucune activité GUS n'a été détectée dans les organes végétatifs (feuilles, tiges, racines).

Plante en floraison

Des fleurs à différents stades ainsi que des capsides encore immatures ont été
15 collectées pour l'analyse histo-chimique de l'expression GUS. Les résultats montrent que les parties vertes de la fleur telles que les sépales et le réceptacle ne présentent pas de coloration GUS. Une expression GUS est cependant détectable dans les pétales mais limitée à la zone supérieure pigmentée. Les étamines ne semblent pas exprimer le gène alors qu'une expression forte est détectée dans le pollen. On observe aussi une
20 coloration bleue au niveau du stigmate (peut être due au dépôt de pollen) ainsi qu'à la base du sac embryonnaire. A l'intérieur du sac embryonnaire, on observe que les ovules développent aussi une expression GUS. Cette activité est modérée et semble surtout localisée dans les cellules de surface. La zone d'abscission entre le style et le sac embryonnaire est aussi fortement colorée. Au niveau des capsides on observe une
25 expression GUS limitée aux graines alors que le placenta et le système vasculaire ne sont pas colorés. Des coupes transversales réalisées dans des graines récoltées dans les capsules vertes montrent que l'expression GUS est essentiellement localisée au niveau des cotylédons de l'embryon alors qu'aucune expression n'est détectée au niveau de l'endosperme.

30 L'analyse histologique de l'activité glucuronidase a permis de localiser précisément le profil tissulaire de l'activité du promoteur P1LOX. L'expression GUS est détectée dans les cotylédons de l'embryon, dans l'hypocotyle et les feuilles cotylédonaires au cours de la germination. Une activité GUS est aussi détectée dans les

organes reproducteurs de la fleur ainsi que dans les pétales. De nombreuses LOXs sont exprimées au cours de la germination ainsi que dans les fleurs ou les fruits. Ces LOXs sont généralement impliquées spécifiquement dans le développement et interviennent dans les processus de croissance et de sénescence cellulaire. L'expression de certains gènes liés à la défense (Henning *et al.*, Plant J., 4:481-493, 1993) peut être cependant détectée dans les fleurs et dans les graines. De plus, Melan et collaborateurs (Plant Physiol., 105:385-393, 1994) ont montré que le gène *AtLOX1* induit lors de la pathogénèse est aussi activé de manière transitoire dans les étapes précoces de la germination des graines d'*A. thaliana*. On peut donc penser que l'expression GUS visualisée dans des organes essentiels pour la survie et la persistance de la plante est aussi en accord avec un rôle de défense et de protection. Celui-ci est d'ailleurs souligné par l'expression GUS détectée dans le collet et dans les zones d'abscission, deux types de tissus correspondant à des zones de communication entre organes. Ce type d'expression tissu-spécifique a aussi été détecté pour d'autres gènes liés à la défense. En particulier il a été montré que le promoteur du gène PRB-1b du tabac s'exprimait spécifiquement dans les zones d'abscission des feuilles et des fleurs (Eyal *et al.*, Plant J., 4:225-234, 1993). L'expression constitutive de la LOX dans ces zones de compartimentation pourrait constituer un obstacle à la colonisation de la plante par un agent pathogène.

20 **Exemple 6: Infiltration d'éliciteur**

Des infiltrations d'éliciteurs sont effectuées à l'aide d'une seringue sans aiguille sur la face inférieure de feuilles adultes de plantes âgées de 8 semaines et cultivées en chambre de culture (photopériode: 16 h jour/8 h nuit; température 25°C jour/22°C nuit; hygrométrie 80 %). Les dosages GUS effectués à partir des plantes élicitées sont réalisés sur des échantillons composés de trois disques foliaires de 1 cm de diamètre prélevés dans les zones traitées. Plusieurs échantillons sont prélevés pour chaque traitement. Les expériences ont été réalisées avec des plantes transgéniques, de génération T1, issues de lignées indépendantes et contenant une ou deux copies du transgène par génome.

30 ***Infiltration d'éliciteur de Ppn (Phytophthora parasitica nicotianae)***

Une préparation de parois de Ppn à 30 µg/ml est infiltrée sur la face abaxiale de feuilles de plantes transgéniques adultes. Des zones d'environ 10 cm² sont infiltrées sauf pour la recherche d'activation systémique du promoteur pour laquelle des demi-feuilles

ont été entièrement infiltrées. Une nécrose totale ou partielle des tissus infiltrés est généralement visible 24 à 48 heures après infiltration. L'étude histo-chimique de l'expression du gène rapporteur 6 à 8 heures après infiltration montre qu'une forte activité GUS est visible dans les tissus infiltrés. Des analyses réalisées 12 et 24 heures après infiltration montrent, qu'à ce stade, la coloration GUS n'est plus visible que sur le pourtour de la zone nécrosée. Aucune induction du gène rapporteur n'est détectée dans des zones infiltrées avec de l'eau ou non infiltrées.

Un dosage fluorométrique de l'activité β -glucuronidase a été effectué à partir de disques foliaires prélevés dans les zones infiltrées. Les résultats obtenus concernent trois lignées indépendantes de plantes transgéniques P1LOX::GUS. On mesure une induction précoce du gène rapporteur dès 4 heures après traitement. Le niveau d'expression maximum est atteint entre 12 et 24 heures après infiltration et correspond à environ 100 fois le niveau mesuré dans des zones infiltrées avec de l'eau. Les résultats obtenus pour des plantes appartenant à la même lignée ou à des lignées indépendantes sont différents en terme d'amplitude mais présentent tous le même profil général.

Des infiltrations de la solution d'éliciteur de *Ppn* ont aussi été réalisées sur des moitiés de feuilles adultes. Ces expériences ont pour but de rechercher l'activation à distance du promoteur P1LOX dans la partie de la feuille non traitée ainsi que dans les feuilles de rang supérieur ou inférieur. Les dosages d'activités GUS ont été réalisés 3 jours et 7 jours après traitement. Une augmentation de l'activité GUS est détectée 3 jours après infiltration dans les tissus non traités proches de la zone infiltrée. Les niveaux d'activité mesurés restent modérés et représentent environ 20% des valeurs mesurées généralement dans des zones infiltrées par l'éliciteur. Cette activité dans les tissus proximaux diminue à 7 jours alors qu'au même stade une augmentation faible de l'activité GUS est mesurée dans des tissus éloignés de la zone infiltrée mais localisés sur la même feuille. Aucune induction d'activité n'a été détectée dans les feuilles non traitées de rang supérieur ou inférieur.

Ces résultats sont représentés aux figures 1-2.

Infiltration de métaux lourds

Des infiltrations de nitrate de plomb (PbNO_3) ont été réalisées pour analyser l'activité du promoteur consécutivement à des traitements par des métaux lourds. Ceux-ci se comportent comme des éliciteurs abiotiques et provoquent la nécrose cellulaire des tissus traités. Nos expériences mettent en évidence une induction de l'activité du gène

GUS après l'infiltration de PbNO_3 à 10 mM. La révélation de la β -glucuronidase, 20 heures après traitement, fait apparaître une forte coloration bleue dans les zones infiltrées en cours de nécrose.

Exemple 7: Réalisation de blessures

- 5 Les blessures sont réalisées sur des plantes au même stade de développement que celles utilisées pour l'infiltration d'éliciteurs. Des feuilles développées sont entièrement blessées à l'aide d'une seringue sans aiguille. L'extrémité de la seringue est appuyée sur la face inférieure de la feuille jusqu'à l'obtention d'une empreinte. Ces traces se nécrosent par la suite au bout du deuxième ou troisième jour après traitement.
- 10 Les dosages GUS effectués à partir des plantes blessées sont réalisés sur des échantillons composés de trois disques foliaires de 1 cm de diamètre prélevés dans les zones traitées. Plusieurs échantillons sont prélevés pour chaque traitement. Les dosages d'activité GUS sont réalisés à partir de disques foliaires prélevés sur des feuilles blessées 24 heures et 7 jours après traitement. Les données obtenues montrent que dans
- 15 les conditions de l'expérience la blessure n'induit pas d'augmentation de l'activité glucuronidase, bien que les zones blessées apparaissent nécrosées.

Exemple 8: Infection racinaire par des zoospores de la race 0 de Ppn

Obtention de zoospores

- Une pastille de mycelium de *Ppn* race 0 préalablement cultivé sur un milieu
- 20 synthétique (Keen, Science, 187:74-75, 1975) est placé sur une toile Agryl P17 (Sodoca, France) placée dans un milieu liquide V8, 5% (jus Campbell). Après 4 jours de culture à 25 °C la toile sur laquelle s'est développé le mycelium est transférée sur de la gélose 1,5 %. Ce transfert entraîne une carence nutritionnelle qui va induire chez le champignon la formation de sporocystes. Au bout de 4 jours de culture à 25°C, le mycelium est
- 25 recouvert de 10 ml d'eau distillée et transféré à 4°C pour 30 minutes. Ce choc thermique provoque la libération des zoospores qui sont récupérées avec le liquide et comptées dans une cellule de Thoma.

Inoculation des plantes

- Des plantes transgéniques de génération T1 cultivées en chambre de culture et
- 30 âgées de 5 semaines sont prélevées et les racines sont débarrassées de la vermiculite. Les racines sont ensuite placées dans un tube de 2.5 ml contenant une suspension de zoospores de la race 0 du champignon à 400,000 spores/ml. Les plantes sont placées en chambre de culture pour la durée de l'expérience. Les plantes témoins, non inoculées,

sont placées dans de l'eau distillée. L'activité GUS dans les plantes infectées est mesurée indépendamment sur les tissus foliaires prélevés au dessus du collet et sur la partie racine-collet.

Mesure de l'activité GUS

- 5 La révélation histo-chimique de la β -glucuronidase montre une induction forte du gène rapporteur dans les racines des plantes inoculées. Une activité GUS est visible dans les racines dès 5 heures après inoculation mais la coloration des tissus est plus intense après 12 heures et 24 heures. Quatre à cinq jours après inoculation, l'activité GUS dans les racines apparaît beaucoup plus faible. Les résultats sont représentés à la figure 3. Dans
- 10 l'ensemble du faisceau racinaire, seules quelques racines principales sont fortement colorées. Plusieurs profils sont observés: certaines racines développent une coloration sur toute leur longueur qui semble concerner toutes les cellules. Sur d'autres racines, on observe une activité intense au niveau des primordiums racinaires ainsi que dans le cylindre central. Une activité GUS intense est aussi visible dans le collet. Les plantes
- 15 non inoculées présentent une activité dans le collet qui est moins intense que dans le cas de l'inoculation. Les racines des plantes non inoculées ne développent pas de coloration GUS. Au cours de l'interaction, le promoteur LOX est peu actif dans les organes aériens. Une expression glucuronidase a cependant été détectée sur les anciennes feuilles cotylédonaire, proches du collet et au niveau des pétioles des premières
- 20 feuilles. Le dosage fluorométrique de l'activité GUS dans les racines de plante inoculées montre une induction rapide, détectable 5 heures après inoculation avec un maximum d'expression entre 12 heures et 24 heures. L'expression diminue ensuite progressivement jusqu'au 3^{ème} jour post-inoculation. Dans les tissus foliaires, prélevés au-dessus du collet, on note une induction de l'expression GUS de plus faible ampleur
- 25 (environ 10 fois moins que dans les tissus racinaires) avec un maximum d'activité mesuré 48 heures après inoculation.

Le promoteur PILOX est induit plus fortement lors d'une interaction incompatible que lors d'une interaction compatible

- L'induction du promoteur a été quantifiée au cours d'une interaction de type
- 30 compatible ou incompatible.

Des plantes 46.8 transgéniques (lignées 5 et 9) ont été infectées soit avec des zoospores de la race 0 de Ppn, (interaction incompatible), soit avec des zoospores de la race 1 (interaction compatible). A 3h, 8h ou 24 h après inoculation, des plantes des deux

lots sont récoltées et utilisées pour des mesures de fluorimétrie. Dès 3h on détecte une activité GUS pour les deux types d'interactions, supérieure à celle détectée dans les témoins non inoculés chez les plantes de la lignée 5. Le temps 8 h discrimine les deux types d'interactions : l'activité spécifique mesurée chez des plantes résistantes est plus importante que celle mesurée chez des plantes sensibles. A 24 h elle est deux fois supérieure. L'activité spécifique dans les plantes non inoculées reste quasi-nulle. Des résultats similaires sont obtenus chez les plantes de la lignée 9.

Ces résultats semblent montrer que la lipoxigénase est induite beaucoup plus fortement pendant une interaction incompatible que lors d'une interaction compatible.

10 **Exemple 9: Traitements par des messagers secondaires et des produits phytosanitaires**

Ces expériences ont pour but d'analyser l'influence de molécules régulant l'activité de gènes de défense sur l'activité du promoteur P1LOX. On distingue classiquement trois voies de transduction des signaux déclenchant les réactions de défense : une voie mettant en jeu le méthyl-jasmonate, une autre qui concerne l'acide salicylique et une troisième qui fait intervenir l'éthylène. Ces trois molécules ont donc été testées sur l'induction du promoteur pour caractériser quelle voie de signalisation est mobilisée pour réguler l'activation du promoteur P1LOX au cours de la pathogénèse. Il faut noter que nous avons utilisé de l'ACC (acide 1-aminocyclopropane-1 carboxylique) plutôt que l'éthylène gazeux. L'ACC, substrat de l'ACC oxydase, est le précurseur direct de l'éthylène.

Par ailleurs deux produits issus de l'industrie phyto-sanitaire, le Bion® (Novartis) et l'Aliette® (Rhône-Poulenc) ont aussi été testés. L'Aliette est la formulation commerciale du fosetyl-Al, un produit utilisé comme fongicide systémique en particulier contre les champignons oomycètes.

Le Bion est la formulation commerciale du BTH (benzo(1,2,3)thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester), un analogue chimique de l'acide salicylique qui induit l'acquisition d'une résistance systémique (SAR) chez les plantes traitées.

Les graines transgéniques T1 sont stérilisées et mises à germer sur un milieu gélosé MS contenant 150 µg /ml de kanamycine. Les plantes sont récoltées à 6 semaines après semis et placées dans des boîtes de Pétri contenant un milieu liquide MS 0,1X, pH 5.8, sans saccharose et contenant 0.001 % de Triton X100. Les solutions concentrées

des différentes molécules ou produits testés sont ensuite rajoutées dans le milieu pour atteindre les concentrations suivantes :

Methyl jasmonate (Aldrich) : 200 μ M, 500 μ M et 1 mM

ACC (Sigma) 1mM

5 Acide salicylique (Sigma) 50 μ M, 200 μ M et 1mM.

BION[®] 500 mg/l soit 1.2 mM substance active

ALIETTE[®] 125mg/l soit 282 μ M substance active

Les boîtes sont scellées avec du Parafilm et placées en chambres de culture durant 24 heures avant analyse de l'activité GUS. Les dosages de l'activité GUS sont
10 réalisés sur des échantillons correspondant à 3 plantes rassemblées.

Traitement avec l'ACC (acide 1-aminocyclopropane-1 carboxylique)

Les expériences réalisées avec de l'ACC 1mM ont permis de mesurer des inductions modérées de l'activité glucuronidase, qui varient selon les lignées d'un facteur 1.5 à 2.

15 ***Traitement avec le MeJa (méthyl jasmonate)***

Les plantes traitées par le méthyle jasmonate ont permis de mettre en évidence une induction de l'activité GUS élevée. Les plantes PILOX ont été traitées avec 250 μ M ou 500 μ M de MeJa. L'induction du promoteur est révélée par mesure en fluorimétrie de l'activité GUS sur 3 lots de 2 plantes. Toutes les plantes traitées
20 présentent une activité GUS de 2 à 8 fois supérieure à celle des témoins après un traitement par 250 μ M de MeJA. Les résultats sont représentés à la figure 4. Les mêmes résultats sont obtenus avec une concentration de 500 μ M. Une expérience a cependant permis d'atteindre une valeur d'induction maximale d'un facteur 15. L'analyse histo-
chimique de l'activité glucuronidase a montré que l'induction d'activité semble avoir
25 lieu préférentiellement dans les feuilles. Il faut noter qu'une activité GUS résiduelle est détectée dans les feuilles cotylédonaire des plantes non traitées.

Traitement avec SA (acide salicylique)

Les dosages de l'activité GUS après application d'acide salicylique n'ont pas révélé d'activation de l'expression GUS dans les plantes traitées. La coloration des
30 plantes traitées par le SA est similaire à celle des plantes non traitées et ne met pas en évidence un effet inducteur du SA sur le promoteur PILOX. Ces résultats sont confirmés par des mesures en fluorimétrie qui ne montrent pas non plus un effet inducteur du SA sur le promoteur PILOX aux doses testées.

Il a précédemment été montré sur cultures cellulaires que le SA inhibe une voie de signalisation induite par *Ppn* : des cellules traitées par une combinaison SA + éliciteur de *Ppn* ont une production d'éthylène inférieure à celle de plantes traitées par l'éliciteur seul (Rickauer et al., *Planta*, 202:155-162, 1997). Il était intéressant d'étudier l'effet du SA sur l'activité inductrice de l'éliciteur de *Ppn* sur la voie de signalisation LOX dans nos plantes transgéniques. Des plantes traitées avec l'éliciteur montrent une importante coloration bleue, tant au niveau des feuilles que des racines. Lorsque les plantes sont traitées par l'éliciteur et le SA, cette coloration est moindre, suggérant que le SA a également un effet antagoniste sur l'induction de la LOX par l'éliciteur.

10 ***Traitement avec H₂O₂***

Le peroxyde d'hydrogène a été utilisé pour tester l'effet d'une molécule impliquée dans le choc oxydant sur le promoteur P1LOX. Les plantes transgéniques ont été traitées par trois concentrations de peroxyde hydrogène (200 µM, 2 et 20 mM), en présence ou non de catalase (qui détoxifie l'H₂O₂ *in planta*). L'activité GUS est détectée histochimiquement après 1h ou 4 h de traitement. Dans ces conditions, aucun effet inducteur de l'eau oxygénée sur le promoteur P1LOX n'a été mis en évidence. Nous avons par ailleurs produit de l'eau oxygénée directement dans nos milieux de traitement en utilisant la glucose oxydase et le glucose (6mM). Ces essais ne mettent pas non plus en évidence un effet inducteur de l'H₂O₂ sur le promoteur P1LOX.

20 ***Traitement avec des produits phytosanitaires***

Le dosage de l'activité GUS dans les tissus de plantes traitées par une solution d'Aliette à 125 mg/l a permis de mettre en évidence une augmentation nette de l'activité. Sur deux lignées transgéniques indépendantes, on mesure des niveaux d'activation compris entre 2 et 8 avec une moyenne de 4.5. Ces résultats sont confirmés par l'analyse histo-chimique de la glucuronidase qui montre l'apparition d'une coloration bleue dans les plantes traitées. L'induction semble concerner les tissus foliaires ainsi que les racines.

Le promoteur LOX n'est pas induit par le BION. En effet, l'ensemble des expériences réalisées sur deux lignées transgéniques indique une induction moyenne de l'activité d'un facteur 1.5.

Revendications

- 1) Polynucléotide comprenant une séquence de régulation promotrice de plante caractérisé en ce qu'il comprend le polynucléotide de la SEQ ID No. 1.
5
- 2) Polynucléotide caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide choisi parmi les polynucléotides suivants:
 - a) un polynucléotide capable de s'hybrider de manière sélective au polynucléotide de la SEQ ID No.1; et
 - 10 b) un polynucléotide homologue à au moins 80 % au polynucléotide de la SEQ ID No. 1.
- 3) Polynucléotide selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il a une activité promotrice dans les cellules végétales et les plantes.
15
- 4) Polynucléotide selon l'une des revendications 2 ou 3 caractérisé en ce que ladite activité promotrice est induite en réponse à une agression par un pathogène.
- 5) Cassette d'expression fonctionnelle dans les cellules végétales ou les plantes
20 comprenant dans le sens de la transcription, une séquence de régulation promotrice en 5', une séquence codante et une séquence de régulation en 3', caractérisée en ce que la séquence de régulation promotrice en 5' comprend un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 4.
- 25 6) Cassette d'expression selon la revendication 5 caractérisée en ce que la séquence codante comprend une séquence codant pour un gène rapporteur ou une séquence codant pour une protéine d'intérêt.
- 7) Cassette d'expression selon la revendication 6 caractérisée en ce que la protéine
30 d'intérêt est une protéine conférant aux plantes des propriétés de résistance aux maladies ou aux insectes.
- 8) Cassette d'expression selon la revendication 7 caractérisée en ce que la protéine

d'intérêt est choisi parmi les éliciteurs fongiques ou les peptides lytiques.

- 9) Vecteur comprenant un polynucléotide selon l'une des revendications 1-8.
- 5 10) Procédé de transformation des cellules végétales caractérisé en ce qu'il consiste à intégrer dans le génome des dites cellules végétales au moins un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 4, au moins une cassette d'expression selon l'une des revendications 5 à 8 ou un vecteur selon la revendication 9.
- 10 11) Cellules végétales transformées caractérisées en ce qu'elles comprennent un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 4, une cassette d'expression selon l'une des revendications 5 à 8 ou un vecteur selon la revendication 9.
- 12) Procédé d'obtention de plantes transformées caractérisé en ce que:
- 15 a) on transforme des cellules végétales par intégration dans le génome des dites cellules végétales d'au moins un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 4, d'au moins une cassette d'expression selon l'une des revendications 5 à 8 ou d'un vecteur selon la revendication 9; et
- b) on régénère une plante à partir des cellules végétales transformées.
- 20 13) Procédé d'obtention de plantes transformées caractérisé en ce que:
- a) on transforme des cellules végétales par intégration dans le génome des dites cellules végétales d'au moins un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 4, d'au moins une cassette d'expression selon l'une des revendications 5 à 8 ou d'un
- 25 vecteur selon la revendication 9; et
- b) on régénère une plante à partir des cellules végétales transformées, et
- c) on croise la plante régénérée avec d'autres plantes.
- 14) Plantes transformées susceptibles d'être obtenues par un procédé selon les
- 30 revendications 12 ou 13.
- 15) Plantes transformées caractérisées en ce qu'elles comprennent un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 4, une cassette d'expression selon l'une des

revendications 5 à 8 ou un vecteur selon la revendication 9.

- 16) Plantes transformées caractérisées en ce qu'elles contiennent des cellules transformées selon la revendication 11.

5

- 17) Plantes transformées selon l'une des revendications 14 à 16, caractérisées en ce qu'elles sont choisi parmi les plantes suivantes : le tabac, le blé, l'orge, le sorgho le riz, le maïs, le soja, le colza, le coton, le tournesol, la betterave, le trèfle.

- 10 18) Graines des plantes transformées selon l'une des revendications 14 à 17.

1/5

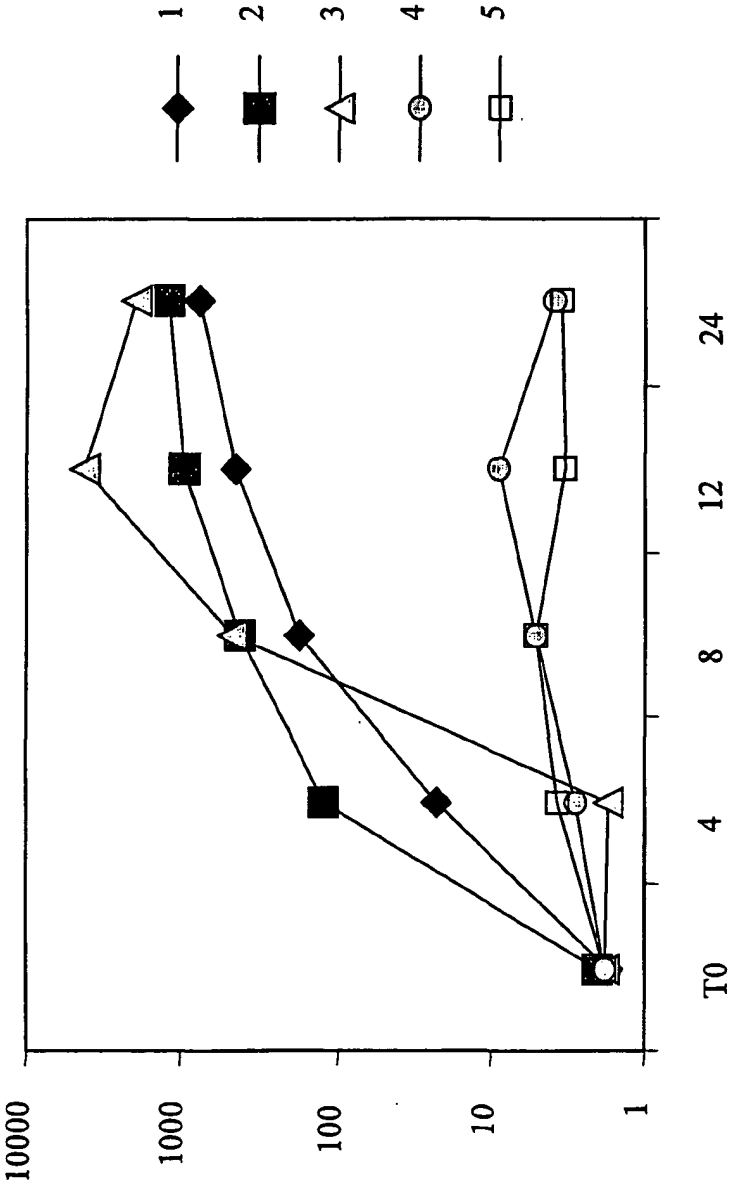


Fig. 1A

2/5

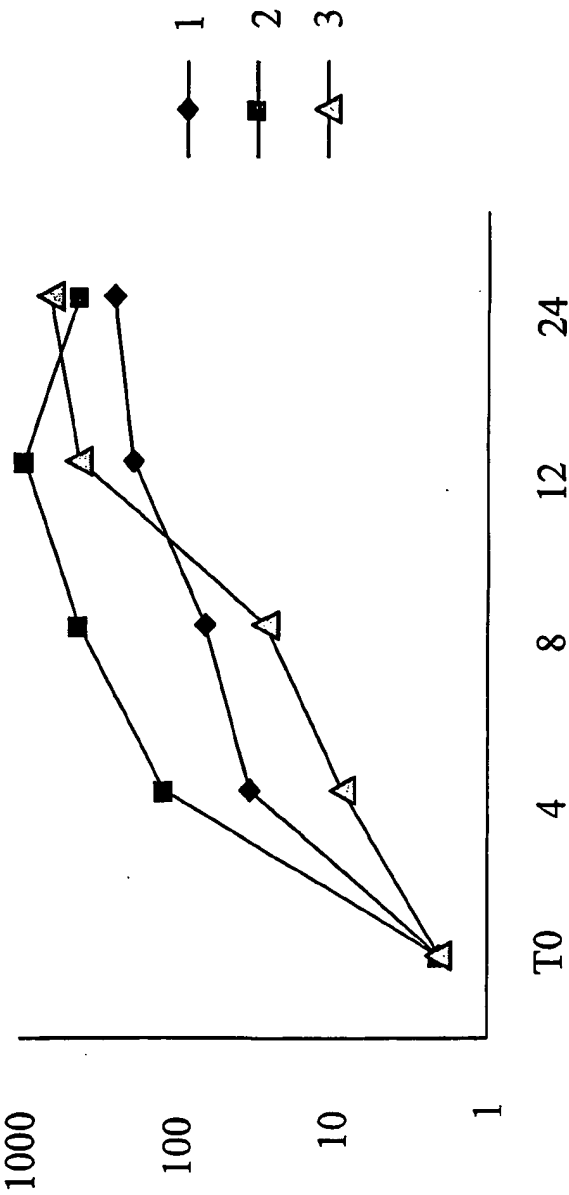


Fig. 1B

3/5

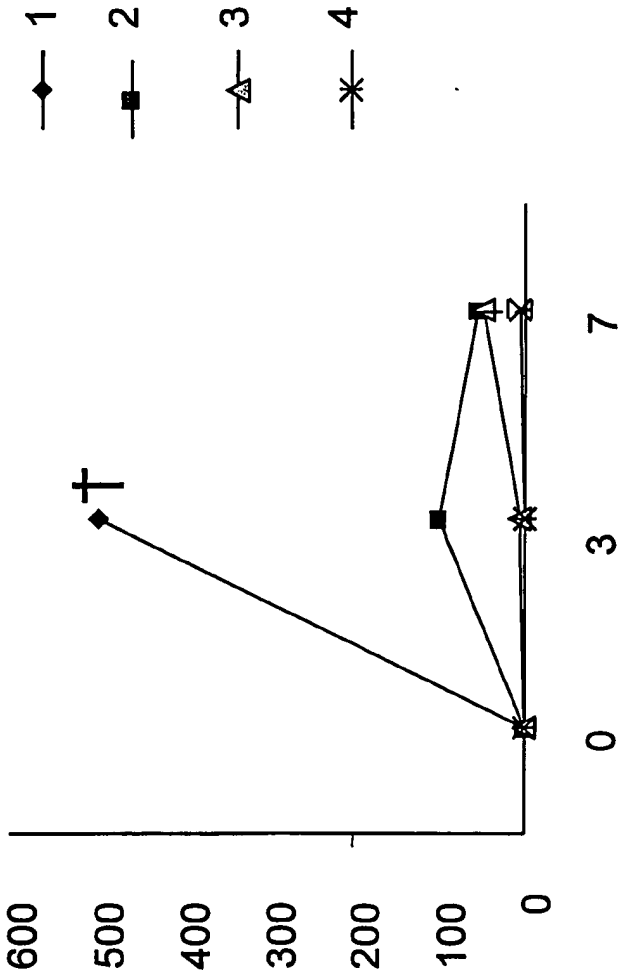


Fig. 2

4/5

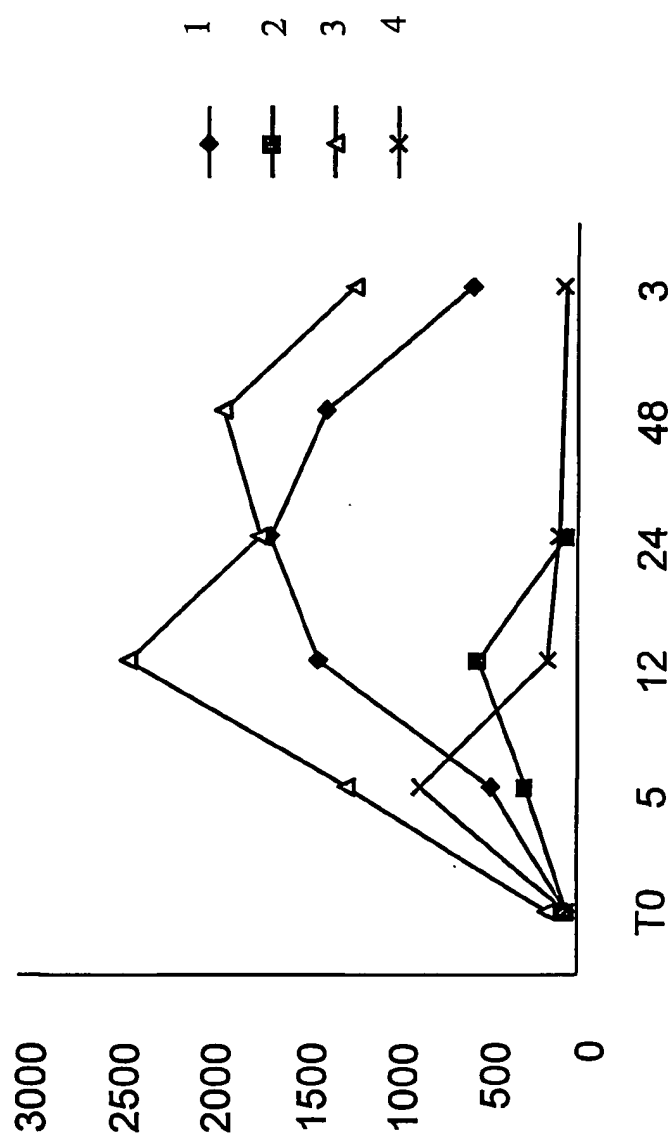


Fig. 3

5/5

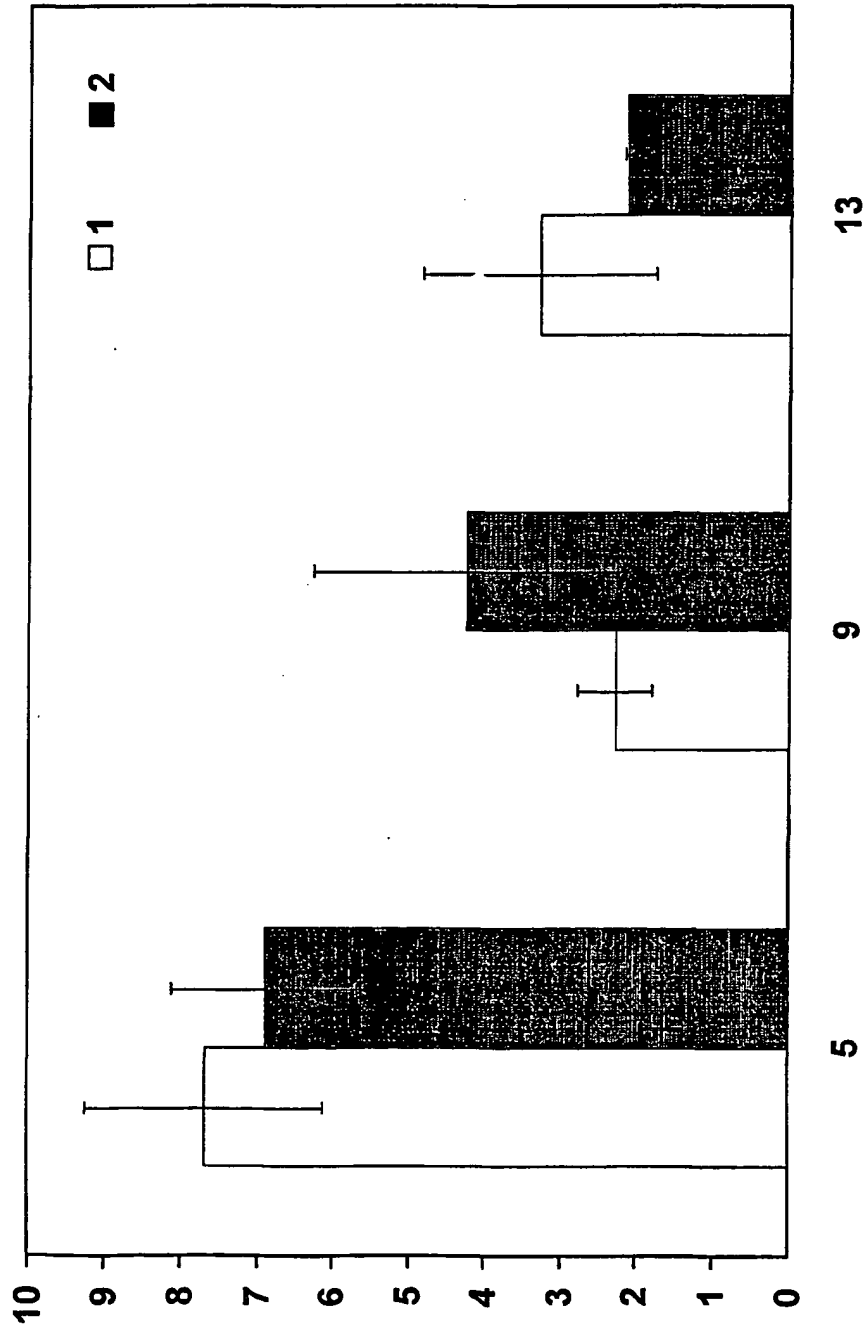


Fig. 4

LISTE DE SEQUENCES

<110> RhoBio SA

<120> Promoteur inductible de lipoxygenase, cassettes
d'expression le comprenant et plantes transformées

<130> PM00034

<140>
<141>

<150> FR 00 09250
<151> 2000-07-13

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 2330
<212> ADN
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> TATA_signal
<222> (2178)..(2185)

<220>
<221> misc_feature
<222> (2301)..(2303)
<223> ATG codon d'initiation de la traduction

<220>
<221> misc_feature
<222> (1989)..(1992)
<223> Core ACGT/Boite G

<220>
<221> misc_feature
<222> (1847)..(1850)
<223> Core ACGT/Boite G

<220>
<221> misc_feature
<222> (1636)..(1639)
<223> Core ACGT/Boite G

<220>
<221> misc_feature
<222> (1162)..(1165)
<223> Core ACGT/Boite G

<220>
<221> misc_feature
<222> (1038)..(1041)
<223> Core ACGT/Boite G

<220>
<221> misc_feature
<222> (189)..(192)
<223> Core ACGT/Boite G

<220>
<221> misc_feature
<222> (67)..(70)
<223> Core ACGT/Boite G

<220>
<221> misc_feature
<222> (1938)..(1945)
<223> Boite ERE

<220>
<221> misc_feature
<222> (576)..(584)
<223> Boite ERE

<220>
<221> misc_feature
<222> (513)..(520)
<223> Boite ERE

<220>
<221> CAAT_signal
<222> (2055)..(2059)

<400> 1
gaccattttat ttccctatat atagttctat gaggatcatg aacgctcccg tgttgacaaa 60
atataaacgt ataaaattat tctcataatt gaaagtacat gtatttctac aaaatagaat 120
tgtttctagc tatagtaaaa ttctccatag gagagtaact aaatttaatc aaaatttagt 180
ccatagttac gttgggtagt gaaactagaa tggagtgaac cattactaag attgttattc 240
ttaaaaatgt cactagcaaa tagcaatagg ctctatattc atatcaatag cacgacacgc 300
atcttgtgat gaaaattgtt gattattcaa tcaaaattta atgctcaact atacttatat 360
ggagatccat cattgacatc aattgagttt tatatataat tttgtacct aggttgtata 420
tataaaataa taaaatagta ttgatgcatt tgaataataa aaaagagaag agaaaggatt 480
ttgacaagaa aggcaaaaaa atttcataga ggaattgaac agaaaaatta aaatattagg 540
attcaaatca ctccacttgt ttgcttgtgg ggaagaattg accacataga caacaagaga 600
aaataaattt gaaatgcatt taattggcta tgatcagctt ccttactcat atcctacaag 660
aaaagaggaa aagtattatt ggaaggggct tttcttagtt tgaaagttca gaagaagatg 720
gcaaatgact tttccaagtc agagtgcgac atatgactat ttcttaaagc attttaattt 780
ttaataaaca catatacagt caaacctctc tataacatgt ttgttccgaa attttttgac 840
tgctatagta aagtgttgtt atagaaaaca tatatattat aacatgcata atataactat 900
cggctcgtgag aaaaattcgg attttaaaat aaatgactgt tatatagggg tattgttata 960
gagcatctga ttgtagtagc gtcgtacact taatctaaac gatgcatgtg ggtaaatatt 1020
gatgatagac aaactcaacg tcaaaaaagt aattagaaag gcaatacacg agtcttatta 1080
gggtaaaaaa acatactata actattgagg taatcatctg attgaaatta ctattataaa 1140
ttgtaacaat agaacaacta tacgtaacca aagtgttttt ctaagaatga ggggttaatta 1200
cacgcacgcg gtgtttatat caaacaatg aagaagagca atggataaat gttcaaaaat 1260
gataatttta tttacctctt acatacaatg tgtaaaatac ttccatcacac tccttgcaag 1320
ttgcaactaa ttaactagca caatttttga atattacaac aattctaate gttttgaaat 1380
gagatgcaaa cgcacaaat tacctcggca aagatggaat ttccacggc acatataaaca 1440
aagcaaaact acggagtgtg gacgattttg agcgaatcgt tttttttttt gggggaaaaa 1500
atatttttga ggaagagctt gtttatgttt tacggatgtt ccaaatatta aacaacttat 1560
tttagttaga aaattagata aacatgaata acagataatg aataagtatt ttcagaatca 1620
ctccaactaa gattgacgtg tagattttta gaaaggtaaa agaaattcat ttgggcccaa 1680
gaattatcca cgtaaaataa cctgtgcaga cattaattgc tgtaaaattt tatccgcatg 1740
agtatttcta ccaagtcata ttatattatt atgggttaagt gaattaataa ggtaataata 1800
tatattaatt aactatgatt aagtaataaa ttttattttt aaacatacgt tatgcattta 1860
ttaattattt aatgtaaaaa tccgatacag ataatttttt tgcgaaggca aaaagaaaaa 1920
gaagaagaag aatgaagaat tggccaaact ttttgaggat ttttgagaat agaagaggaa 1980
aattgaaaac gtacttgcta cccatcatgt gctataaata aatctttttt taataaataa 2040
aaggataata aagaccaata tggacagacg atagctagac aggaaagtgt gaatatagag 2100
atggcttttg tatttttctt tttttccctt ttttattgtt tttcttttatt ctcaactaga 2160
caactacttg ttcttgctat aaatatcaga tttcctagtt agaaacttca caacacaaat 2220
taaattaaac tcacttaaat tctattttct ttcgttttct tggaagggtta ttgagagaga 2280

3

aagttatcaa acagttaata atgtttctgg agaagattgt ggatgcaatc

2330

<210> 2

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Amorce
Sens

<400> 2

ccctttctag accatttatt tccc

24

<210> 3

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Amorce
Anti-sens

<400> 3

ctgtgattcc cgggacaatc ttct

24